

Kontrast forstærket transrektal ultralydskanning af patienter med rektal cancer.

Søren R. Rafaelsen
Torben Sørensen
John Pløen
Anders Jakobsen
Flemming Bech-Knudsen
Hans Rahr
Jan Lindebjerg

Dato: 10.09.2008

**Kontrast forstærket transrektal ultralydskanning af
patienter med rektal cancer.
Kvantitativ respons evaluering.**

INVESTIGATORER

Investigatorer:

Overlæge, lektor, Søren R. Rafaelsen E-mail:Soeren.Rafael.Rafaelsen@slb.regionsyddanmark.dk

Overlæge, Torben Sørensen

Overlæge, John Pløen

Professor, overlæge dr. med., Anders Jakobsen

Overlæge, Flemming Bech-Knudsen

Ledende overlæge, dr. med., Hans Rahr

Overlæge, Jan Lindebjerg

DELTAGENDE AFDELINGER

Røntgen - , onkologisk - , organkirurgisk - og patologisk afdeling Vejle Sygehus.

Databehandling : Klinisk Forskningsenhed, Vejle sygehus.

1 PROTOKOLRESUMÉ

TITEL: Kontrast forstærket transrektal ultralydskanning af patienter med rektal cancer. Kvantitativ respons evaluering.

FORMÅL:

Primære formål:

- Sammenligne kvantitative ultralydparameter før og under behandling af tumor med den histopatologiske Tumor Regression Grade (TRG score).
- Man ønsker endvidere at vurdere den andel af patienter, som opnår komplet respons ved behandlingen.

Sekundære formål:

- Tid til lokal recidiv eller fjerne metastaser.

DESIGN:

En prospektiv undersøgelse.

BEHANDLINGSPLAN:

Patienterne rekrutteres til protokollen når præoperativ strålebehandling kommer på tale. Patienterne informeres om protokollens formål og rationalet bag.

ADMINISTRATIVT:

Undersøgelsen er investigator initieret.
Studiestart: ultimo 2008
Inklusionsstop: 2010
Klinisk follow-up: Til progression eller død.
Antal patienter: 30 patienter.

POPULATION:

Patienter med endetarmskræftkræft der skal til præoperativ radiokemoterapi. Dvs patienter med T3 tumorer med kort afstand til den mesorektale fascie eller T4.

INKLUSIONSKRITERIER:

1. Patienter med biopsi verificeret adenocarcinom i rektum ≤ 10 cm fra anal åbningen.
2. T3/4 bedømt ved transrektal ultralydskanning og MR og CRM^{MR} < 5 mm.
3. Forventet levetid på mere end 3 mdr.
4. Alder ≥ 18 år.
5. Performance status ≤ 2 i henhold til WHO.
6. Patienten skal være i stand at overholde protokollen, ifølge prokollens retningslinjer.
7. Der skal foreligge underskrevet informeret samtykke fra patienten.

EKSKLUSIONSKRITERIER:

1. Tidligere stråle behandlet
2. Patienter med kendt fjerne metastasering.
3. Patienter med hjertesygdom.
4. Anden malign lidelse end rektal cancer fraset kurativt behandlet basalcelle- og planocellulære carcinomer i huden og tidligere behandlet carcinoma in situ cervicis uteri.
5. Pacemaker
6. Anden tilstand eller sygdom, der efter investigators skøn gør det uhensigtsmæssigt for patienten at deltage i forsøget.

UNDERSØGELSESPPLAN OG BEHANDLINGSPLAN:

	Baseline Uge (1-0)	2 uger.	Præopertivt (6 uger)
Objektiv undersøgelse Registrering af patientdata/ sygdomsstatus og tumor karakteristika	x	x	x
Vægt	x	x	x
Performance status	x	x	x
CT	x		x
TRUS med Sonovue	x	x	x
MR	x		x
Biopsi	x	x	

* TRUS efter 2 og 6 uger er eneste ekstraundersøgelser i forhold til afdelingens retningslinjer.

2 INTRODUKTION OG BAGGRUND

Baggrund :

Man ønsker med dette studie at belyse, om en non-invasiv præoperativ test på et tidligt tidspunkt kan forudsige respons på radio-kemoterapi behandling også før en eventuel størrelsesændring af tumor.

Ultralyd kan bedømme tumors vaskularitet på to måder. Farve - og power Doppler kan identificere blodgennemstrømning i tumorkar og hastigheden i blodkar kan måles [1], men blodgennemstrømningen i væv kan ikke bestemmes. Ved hjælp af ultralydkontrast kan små blodkar med en diameter på 50-100 μm identificeres. Kvantificering af blodflow i væv og vaskulær volumen kan bestemmes med ultralydkontrast. Tids-intensitets-kurven for tumoren er afhængig af perfusion og flow volumen pr tidsenhed. Dette kan bestemmes med en kinetisk model. Til dato foreligger der ingen studier af kvantitativ kontrastultralydskanning af primær rektum tumor før, under og efter radiokemoterapibehandling sammenholdt med det histopatologiske respons bedømt ved tumor response grade (TRG). Metoden er fornylig anvendt til vurdering af prostatasvulster [2]. Desuden har metoden været anvendt til vurdering af levermetastaser[3-6]. CT og PET/CT har været anvendt til respons evaluering ved cancer recti under strålebehandling [7,8], men kan ikke med sikkerhed forudsige respons[9]. Fordelen ved kontrastforstærket ultralyd er, at metoden er sikker, billig og hurtigt kan gentages [10]. Metoden har også været anvendt til evaluering af lymfeknuder ved mamma cancer og malignt melanom [11]. Ultralyd softwaren der anvendes til den objektive kvantificering reducerer observatør variationen. Ofte sker ændringer af tumor volumen længe efter start af behandling, hvorimod tidlig påvisning af tumor respons vil kunne bekræfte sandsynligheden for effektiviteten af behandlingen på et tidligt tidspunkt.

Gennem de seneste år har radiokemoterapi ved rektal cancer vist sig effektiv til at sikre lokal kontrol og regression af tumor. For at optimere resultaterne og identificere en undergruppe af patienter, der responderer bedst på behandlingen, undersøges om tumors kinetik har betydning for det endelige resultat. Metoden vil måske i fremtiden kunne være med til at udvælge de patienter, hvor kirurgi ikke er nødvendig. I nær fremtid påbegyndes et protokolleret dansk multicenter studie på dette område.

3 FORMÅL

Primære formål:

- Belyse kontrastforstærket transrektal ultralydskannings evne til at forudsige respons på et tidligt tidspunkt; ved at sammenligne kvantitative ultralydparameter før, under og efter behandling af tumor med den histopatologiske Tumor Regression Grade (TRG score).

- Man ønsker endvidere at vurdere den andel af patienter, som opnår komplet respons ved behandlingen.

Sekundære formål:

- Tid til lokal recidiv eller fjernmetastaser.

4 UNDERSØGELSENS DESIGN

4.1 Beskrivelse

Den foreslåede kliniske undersøgelse er en prospektiv undersøgelse.

Efter informeret samtykke tilbydes den kvantitative kontrast undersøgelse. TRG respons er primære endpoint.

4.2 Tidsplan

Undersøgelsen forventes at påbegynde ultimo 2008 og inklusionsstop forventes i 2010.

4.3 Årsager til afbrydelse af undersøgelsen

Uønsket reaktion

En patient kan afbryde behandling efter en svær eller livstruende uønsket reaktion, som forhindrer yderligere behandling efter den ansvarlige læges skøn.

Patienten ønsker at afbryde behandlingen

Behandling skal stoppes hvis patienten ikke ønsker at fortsætte i undersøgelsen.

Større protokolovertrædelse

Patienter som ikke bliver opereret vil blive taget ud af undersøgelsen.

4.4 Afslutning af studiet før planlagt tid

Studiet vil blive stoppet:

- ✓ Hvis opståede uønskede hændelser er af så alvorlig art, at fortsættelse af undersøgelsen bliver uacceptabel.
- ✓ Hvis rekrutteringsraten er for lav til at man kan forvente gennemføre undersøgelsen i dens nuværende form indenfor en acceptabel tidsperiode.
- ✓ Hvis antallet af drop-outs af administrative årsager er for høj, og denne situation ikke kan udbedres.

5 UNDERSØGELSENS POPULATION OG UNDERSØGELSER FØR START

5.1 Population

Patientgruppen vil være patienter med rektum cancer ≥ 18 år, med lokal avanceret sygdom der kræver præoperativ radiokemoterapi. Patienterne skal have performance status ≤ 2 . Og en forventet restlevetid på mindst 3 måneder. Patienterne må ikke have fjernmetastaser bedømt ved CT skanningen af thorax og abdomen. Det drejer sig om samme patientpopulation som til den igangværende protokol til belysning af den prædiktive effekt af fortløbende rektoskopi med biopsitagning ved kemo-strålebehandling: *Konsekutive rektoskopier foretaget i forbindelse med præoperativ kemostråleterapi af rektum tumorer på Vejle Sygehus*. Komité nr.: S-20070123.

5.2 Inden behandlingen påbegyndes foretages:

1. Bestemmelse af sygdommens lokale udbredning ved MR skanning.
2. Der foretages rutine CT skanning af thorax og abdomen med henblik på påvisning af evt fjernmetastaser.
3. Endelig beslutning om behandlingstilbud tages på tværfaglig konference (Kirurg, patolog, onkolog og radiolog), hvor alle patientens undersøgelser gennemgås og behandlingsmulighederne diskuteres.
4. Anamnese.
5. Objektiv undersøgelse, BT, temperatur, vægt, højde og WHO performance status.

5.3 Inklusionskriterier.

1. Patienter med biopsi verificeret adenocarcinom i rektum ≤ 10 cm fra anal åbningen.
2. T3/4 bedømt ved transrektal ultralydskanning og MR og CRM^{MR} < 5 mm.
3. Forventet levetid på mere end 3 mdr.
4. Alder ≥ 18 år.
5. Performance status ≤ 2 i henhold til WHO.
6. Patienten skal være i stand at overholde protokollen, ifølge prokollens retningslinjer.
7. Der skal foreligge underskrevet informeret samtykke fra patienten.

5.4 Eksklussions kriterier.

1. Tidligere stråle behandlet mod bækkenet.
2. Patienter med kendt fjernmetastasering.
3. Alvorlig sygdom der kontraindicerer behandling, herunder hjertesygdom.
4. Anden malign lidelse end rektal cancer fraset kurativt behandlet basalcelle- og planocellulære carcinomer i huden og tidligere behandlet carcinoma in situ cervicis uteri.
5. Pacemaker
6. Anden tilstand eller sygdom, der efter investigators skøn gør det uhensigtsmæssigt for patienten at deltage i forsøget.

6 Kontrastforstærket transrektal ultralydskanning:

Alle patienter undersøges med en 4-8 MHz EV8-C4 ultralydsprobe forbundet med en Sequoia 512S (Acuson Corporation, Siemens, Mountain View, CA, USA) med software version 10.0, der giver "contrast pulse sequence imaging" (CPS, med lav acoustisk energi: mekanisk indeks: 0.13).

Apparatur indstillingerne holdes konstante under skanningerne.

Først udføres almindelig ultralydskanning med sagitale og transverselle billeder.

På det billede, hvor tumor har den største diameter i sagitalplanet i forhold til tumor, måles kontrastoptagelsen og kontrastudskillelsen ved hjælp af CPS.

Der anvendes standard ultralydkontrast: SonoVue™ (BR1; Bracco, Milan, Italy). Der injiceres en bolus på 4 ml SonoVue intravenøst ved hjælp af en VueJect pumpe (Bracco, Milan, Italy). Pumpen sikrer en konstant og reproducerbar injektionshastighed.

VueJect® er en injektionspumpe, der er beregnet til at levere en suspension af ultralydskontrastmidlet SonoVue® i en kontinuerlig infusion og/eller en bolus.

Pumpen roterer sprøjten varsomt for at bevare suspensionen intakt. Brugeren kan bestemme injektionsmetoden samt infusionshastigheden. Et specielt program beskytter indholdet i sprøjten mod høje tryk, som ville kunne forstyrre suspensionen.

Ovenstående egenskaber opnås ved anvendelse af en speciel sprøjte med tilhørende slangesæt.

Infusionshastigheden er programmerbar fra 0,3 til 4,0 ml/minut med 0,1 ml/minuts intervaller.

For at lette anvendelsen leveres VueJect® med fjernkontrol som komplement til styreknapperne på pumpen.



Efter skanningen skylles efter med 5 ml sterilt fysiologisk saltvand. Hele undersøgelsen optages på en disk, og der udprintes måleresultater. Optagelsen af måleresultaterne tager kun få minutter.

Opladnings karakteristika af tumorerne måles. Intensiteten inddeles i fire grupper: 1: ingen opladning, 2: højintens opladning, 3: isointens opladning og 4: lavintens opladning. Time to enhancement (AT), time to peak intensity (TTP), mean transit time (MTT) og peak intensity (PI) af rektumtumorerne måles med ACQ time-intensity curve analyse software (Acuson Corporation, Siemens) for hver patient (region-of-interest [ROI] tegnes over hele tumorområdet. Time to enhancement (AT(arrival time)) defineres som tiden fra injektionsstart til initial opladning. Time To Peak intensity (TTP) defineres som intervallet fra injektionsstart til toppen af time-intensity kurven. Peak Intensity (PI) måles i dB.

Statistik

Data analyseres med Student's t test, χ^2 test, Pearson correlation test og Spearman correlation test med SPSS16.0 Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). En p -værdi mindre end 0,05 betragtes som signifikant.

6.3 Opfølgning:

Efter påbegyndelse af radiokemoterapi gentages kontrast målingerne efter 14 dage og umiddelbart præoperativt. Onkologerne sender henvisning til kontrol skanningen. Målingerne udføres og registreres som ved første skanning. Desuden beregnes ændringerne i målene.

Efter operationen sammenlignes ultralyd fundene med patologens TRG (tumor response grade) bestemmelse. Den histopatologiske analyse af præparatet udføres efter Quirke's protokol. Patologen er blindet overfor skannings resultaterne.

Desuden registres tid til evt. recidiv eller død.

7 FORSØGSPLAN

7.1 Evaluering forud for inklusion

Formålet med disse evalueringer er at identificere patienter, som opfylder de anførte inklusions- og eksklusionskriterier. Patienten informeres mundtligt og skriftligt, og giver sin underskrift på, at hun/han er informeret om undersøgelsen og accepterer at deltage heri.

Følgende parametre skal undersøges/foreligge forud for start.

- ◆ Underskrevet og dateret skriftligt informeret **patientsamtykke**.
- ◆ **Medicinsk anamnese**.
- ◆ **Objektiv undersøgelse**
- ◆ **Performance status:** WHO`s skala.
- ◆ Gennemgang af inklusions/eksklusions checkliste.

7.2 Patienterne følges til død.

7.3 Plan over undersøgelser og behandling.

Patienterne følges efter afdelingens retningslinjer, hver 3. måned i det første år og herefter hvert halve år.

8 UØNSKEDE HÆNDELSER

Uønskede hændelser er uønskede tegn/symptomer, som tilstøder en patient under deltagelse i en undersøgelse, hvad enten de er årsagsrelateret til forsøgsmedicin eller ikke. **Alle uønskede hændelser skal registreres i patientens journal og i CRF.**

Sværhedsgrad og følger af behandlingen skal registreres for hver af de uønskede hændelse. Sværhedsgraden for den uønskede hændelse og sammenhæng med behandlingen skal vurderes i overensstemmelse med de specifikke retningslinjer, der er beskrevet nedenfor.

CTC graderingssystemet for toksicitet skal bruges ved registrering af uønskede hændelser.

Retningslinjer for sammenhæng mellem uønskede hændelser og behandling

1. Ikke-relateret - ingen tidsmæssig sammenhæng, andre ætiologier er meget sandsynligt årsagen.
2. Muligvis relateret - mindre klar tidsmæssig sammenhæng, andre ætiologier er også mulige.
3. Sandsynligvis relateret - klar tidsmæssig sammenhæng med bedring ved afslutningen af behandlingen, og ikke rimeligt forklaret ved patientens kendte kliniske tilstand.
4. Relateret - klar tidsmæssig sammenhæng med behandlingen.

Patienter, der oplever uønskede hændelser, skal monitoreres med relevante kliniske undersøgelser og laboratorieundersøgelser, som bestemt af den behandlende læge. **ALLE uønskede hændelser skal følges til tilfredsstillende løsning eller stabilisering.**

Alle foretagne foranstaltninger og opfølgingsresultater skal registreres i CRF samt i patientens journal. Opfølgende laboratorieresultater skal opbevares i patientens journal.

Alle alvorlige uønskede hændelser, der bedømmes som værende relaterede til behandlingen, skal rapporteres til Lægemiddelstyrelsen. Sværhedsgrad henviser til intensiteten af en reaktion

(dvs. let, moderat, svær etc.). “Alvorlig” henviser til en lovmæssig definition af udfaldet af en hændelse (dvs. fatal, livstruende, medført hospitalsindlæggelse etc.).

En alvorlig uønsket hændelse er en hændelse, som tyder på en signifikant risiko, kontraindikation, bivirkning eller sikkerhedsforanstaltning. Med hensyn til klinisk human erfaring omfatter dette enhver hændelse, som:

- ✓ Medfører døden
- ✓ Er livstruende
- ✓ Medfører hospitalsindlæggelse eller forlænger en allerede eksisterende indlæggelse
- ✓ Er varigt invaliderende
- ✓ Er en medfødt anomali
- ✓ Endvidere kan ændringer i laboratorieværdier kræve rapportering, med mindre andet er specificeret i protokollen

Følgende hændelser i denne undersøgelse skal ikke rapporteres:

En hændelse, som medfører indlæggelse på hospital eller forlænger en eksisterende indlæggelse, hvis den eneste grund til indlæggelsen eller forlængelse er med henblik på følgende:

- ◆ Indlæggelse er sekundær til forventet morbiditet på grund af kemoterapi:
 - knoglemarvssuppression
 - feber
 - kvalme og opkastning
- ◆ Indlæggelse er sekundær til forventet morbiditet på grund af cancer:
 - vægttab
 - træthed
 - smertebehandling
 - angst
 - indlæggelse til palliativ behandling
- ◆ Administrering af kemoterapi
- ◆ Transfusion med blodprodukter
- ◆ Administrering af undersøgelsesprocedure
- ◆ Placering af et permanent intravenøst kateter
- ◆ Hospiceophold til terminalpleje

8.1 Gradering af uønskede reaktioner

Investigator skal forsøge at få klarhed over alle kliniske eller objektive reaktioner hos patienter, der er i behandling, og afgøre deres sammenhæng med behandlingen. Reaktionen(erne) skal, hvis til stede, graderes efter følgende skala:

- 1 = let
- 2 = moderat
- 3 = svær
- 4 = livstruende

9 STATISTISK ANALYSE

9.1 Patientantal

Man regner med at kunne inkludere ca. 30 patienter over et år.

9.2 Baseline

Alle patienter vil blive beskrevet. Antal patienter samt studie-forløbet vil blive vist i et patient-flow-diagram. Deskriptiv statistik vil blive anvendt til at opsummere patientkarakteristika, demografiske og prognostiske variable vil blive tabuleret og vist.

9.3.1 Kriterier for respons

.

9.3.2 Analyse af primære end-point

Den primære endpoint er at finde en sammenhæng mellem de kvantitative mål ved skanningerne og patologens svar (TRG).

9.3.3 Analyse af sekundære end-point

Måleresultaterne søges desuden korreleret til tid til evt. recidiv og restlevetiden.

10 FORSIKRING

Patienten er dækket af den offentlige patientforsikring, hvis der mod forventning skulle opstå skade forårsaget af behandlingen.

Patienterne vil i tilfælde af en skade eller dødsfald, der ikke er relateret til gennemførelsen af undersøgelsen, være dækket af hospitalets forsikring.

11 PUBLIKATION

Data og resultater fra studiet tilhører investigatorerne. Studiet tænkes publiceret i et engelsksproget videnskabeligt tidsskrift. Medforfatterskab og forfatterrækkefølge bestemmes af gruppen. Første investigator udarbejder manuskriptudkast og er 1. forfatter.

12 FINANSIERING

Denne undersøgelse er investigator initieret.

13 ETISK ASPEKT

Undersøgelsen vil blive udført i overensstemmelse med den 5. version af Helsinki Deklarationen og projektet er anmeldt til datatilsynet. Der indgår ikke nyt apparatur i undersøgelsen, transrektal ultralydskanning anvendes i daglig klinisk praksis. Ultralydskontrast(Sonovue) er heller ikke et nyt lægemiddel. Kontrasten er godkendt til makro og mikrovaskulær kontrast sonografisk undersøgelse. Før patienten indgår i undersøgelsen, skal patienten informeres om kontrastultralydskanningen af tumoren og vil få relevante oplysninger om det planlagte formål, mulige resultater og eventuelle uønskede hændelser. Procedurerne og de mulige risici, som patienten udsættes for, vil blive forklaret. Hver patient skal efter at have fået en fuldstændig forklaring på den kliniske undersøgelse afgive skriftligt informeret samtykke, hvis de ønsker at deltage i undersøgelsen.

Patientens deltagelse i undersøgelsen er frivillig. Afslag til deltagelse i undersøgelsen vil være uden konsekvens for patientens efterfølgende behandling. Patienten har ret til at trække sig fra undersøgelsen på et hvilket som helst tidspunkt, og af en hvilken som helst grund, uden at dette får konsekvenser for hendes efterfølgende behandling.

Det drejer sig om samme gruppe patienter som der indgår i Overlæge John Pløen's godkendte protokol: *Konsekutive rektoskopier foretaget i forbindelse med præ-operativ kemostråleterapi af rektum tumorer på Vejle Sygehus.* Nr.: S-20070123 og dette nye ultralydprojekt vil betyde et par ekstra ultralydskanninger i forbindelse med andre i forvejen planlagte undersøgelser.

Vejle Sygehus afholder alle udgifter til forsøget.

14 REFERENCER

1. Barbaro B, Valentini V, Coco C, Mancini AP, Gambacorta MA, Vecchio FM, Bonomo L. Tumor vascularity evaluated by transrectal color Doppler US in predicting therapy outcome for low-lying rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63(5):1304-8.
2. Yang JC, Tang J, Li Y, Fei X, Shi H. CONTRAST-ENHANCED TRANSRECTAL ULTRASOUND FOR ASSESSING VASCULARIZATION OF HYPOECHOIC BPH NODULES IN THE TRANSITION AND PERIPHERAL ZONES: COMPARISON WITH PATHOLOGICAL EXAMINATION. *Ultrasound Med Biol.* 2008 Jun 2. [Epub ahead of print]
3. Wang Z, Tang J, An L, Wang W, Luo Y, Li J, Xu J. Contrast-enhanced ultrasonography for assessment of tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *J Ultrasound Med.* 2007;26(6):757-62.
4. Lassau N, Lamuraglia M, Chami L, Leclère J, Bonvalot S, Terrier P, Roche A, Le Cesne A. Gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib: monitoring response with contrast-enhanced sonography. *AJR Am J Roentgenol.* 2006;187(5):1267-73.
5. Magnon C, Galaup A, Rouffiac V, Opolon P, Connault E, Rosé M, Perricaudet M, Roche A, Germain S, Griscelli F, Lassau N. Dynamic assessment of antiangiogenic therapy by monitoring both tumoral vascularization and tissue degeneration. *Gene Ther.* 2007;14(2):108-17.
6. Lassau N, Brule A, Chami L, Benatsou B, Péronneau P, Roche A. Evaluation of early response to antiangiogenic treatment with dynamic contrast enhanced ultrasound. *J Radiol.* 2008;89(5 Pt 1):549-55.
7. Bellomi M, Petralia G, Sonzogni A, Zampino MG, Rocca A. CT perfusion for the monitoring of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in rectal carcinoma: initial experience. *Radiology.* 2007;244(2):486-93.
8. Capirci C, Rampin L, Erba PA, Galeotti F, Crepaldi G, Banti E, Gava M, Fanti S, Mariani G, Muzzio PC, Rubello D. Sequential FDG-PET/CT reliably predicts response of locally advanced rectal cancer to neo-adjuvant chemo-radiation therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007 ;34(10):1583-93.
9. Kristiansen C, Loft A, Berthelsen AK, Graff J, Lindebjerg J, Bisgaard C, Jakobsen A. PET/CT and histopathologic response to preoperative chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2008;51(1):21-5.
10. Piscaglia F, Bolondi L. The safety of Sonovue in abdominal applications: retrospective analysis of 23188 investigations. *Ultrasound Med Biol.* 2006;32(9):1369-75.

11. Rubaltalli L, Corradin S, Dorigo A, Tregnaghi A, Adami F, Rossi CR, Stramare R. Automated quantitative evaluation of lymph node perfusion on contrast-enhanced sonography. *AJR Am J Roentgenol.* 2007;188(4):977-83.